



IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

In re the application of:

Daniel MONGET et al.

Serial Number: 09/870,510

Group Art Unit: 1623

Filing Date: June 1, 2001

Examiner:

For: METHOD FOR DETECTING MICROORGANISMS AND A SUPPORT
WHICH CAN BE USED IN SUCH A METHOD

CLAIM TO PRIORITY UNDER 35 U.S.C. § 119

Commissioner for Patents
Washington, D.C. 20231

August 3, 2001

Sir:

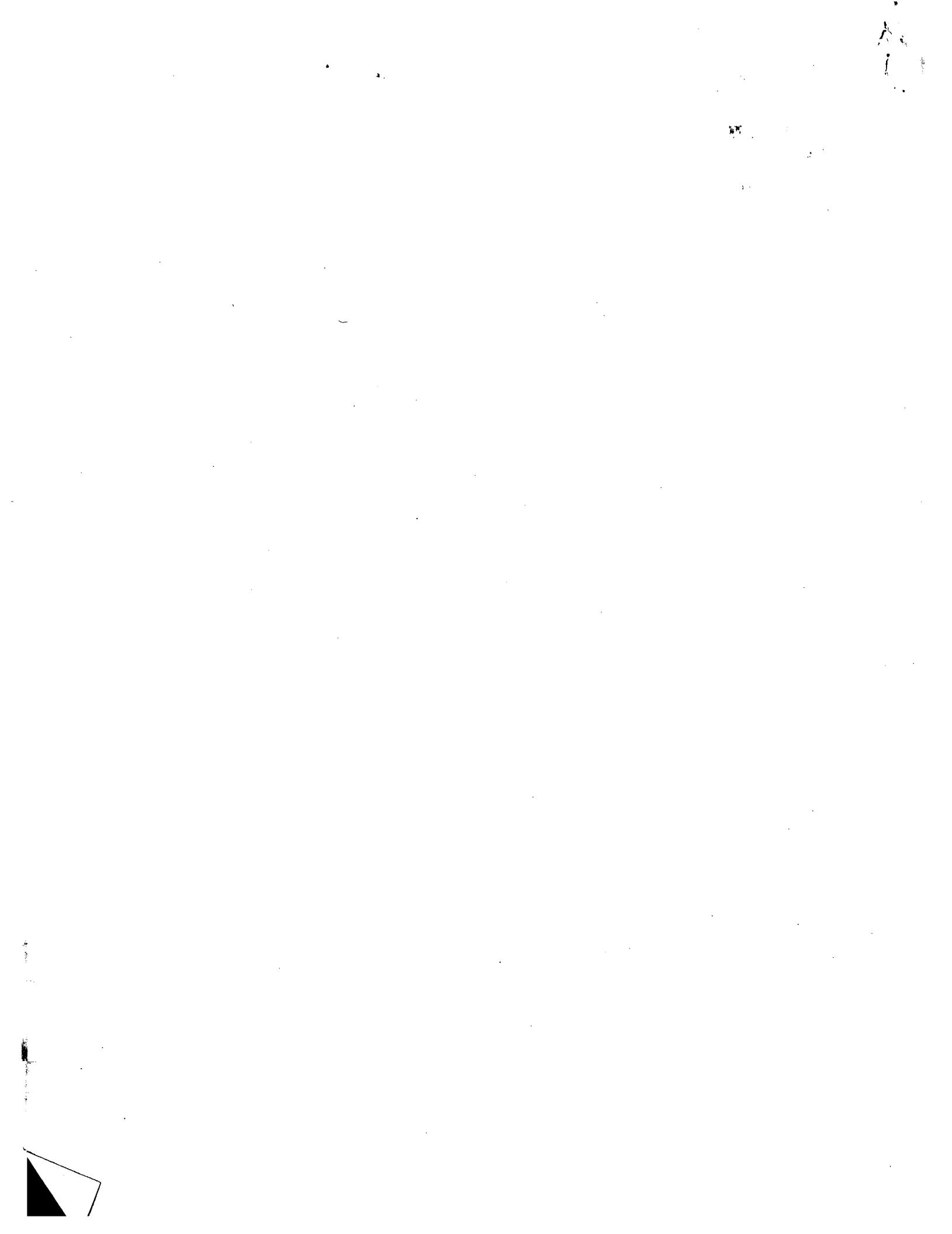
The benefit of the filing date of the following prior foreign application is hereby requested for this application, and the priority provided in 35 U.S.C. § 119 is hereby claimed:

French Patent Application 98/15501, filed December 4, 1998.

In support of this claim, a certified copy of the foreign application is filed herewith.

It is requested that the file of this application be marked to indicate that the applicants have complied with the requirements of 35 U.S.C. § 119 and that the Patent and Trademark Office kindly acknowledge receipt of this document in the next Patent Office communication.

#9
MW
TECH CENTER
AUG 06 2001
PATENT
1600/2000
RECEIVED

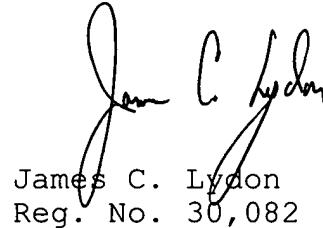


U.S. Patent Appln. S.N. 09/870,510
CLAIM TO PRIORITY

PATENT

Please charge our Deposit Account No. 50-1258 in the event any fees are required for entry and consideration of this Claim to Priority.

Respectfully submitted,

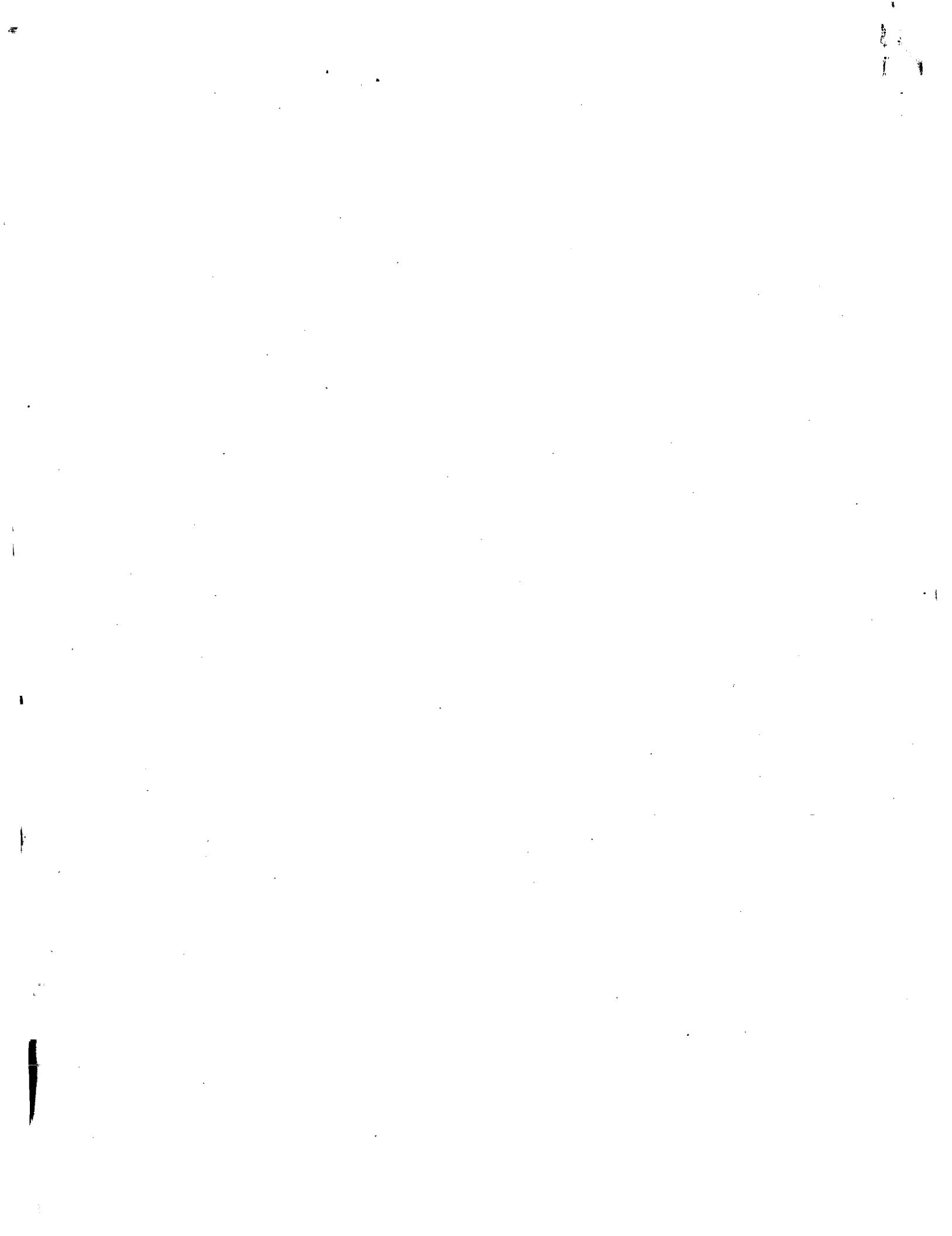


James C. Lydon
Reg. No. 30,082

Atty. Case No.: BONN-054
100 Daingerfield Road
Suite 100
Alexandria, Virginia 22314
Telephone: (703) 838-0445
Facsimile: (703) 838-0447

Enclosure:

Certified copy of French Patent Application 98/15501





TECH CENTER 1600/2000

AUG 06 2001

RECEIVED

BREVET D'INVENTION

CERTIFICAT D'UTILITÉ - CERTIFICAT D'ADDITION

COPIE OFFICIELLE

Le Directeur général de l'Institut national de la propriété industrielle certifie que le document ci-annexé est la copie certifiée conforme d'une demande de titre de propriété industrielle déposée à l'Institut.

08 JUIN 2001

Fait à Paris, le

Pour le Directeur général de l'Institut national de la propriété industrielle
Le Chef du Département des brevets

Martine PLANCHE

INSTITUT
NATIONAL DE
LA PROPRIETE
INDUSTRIELLE

SIEGE
26 bis, rue de Saint Petersbourg
75800 PARIS cedex 08
Téléphone : 01 53 04 53 04
Télécopie : 01 42 93 59 30
<http://www.inpi.fr>

THIS PAGE BLANK (USPTO)

26 bis, rue de Saint Pétersbourg
75800 Paris Cedex 08
Téléphone : 01 53 04 53 04 Télécopie : 01 42 93 59 30

REQUÊTE EN DÉLIVRANCE

Confirmation d'un dépôt par télécopie

Cet imprimé est à remplir à l'encre noire en lettres capitales

Réserve à l'INPI

- 4 DEC. 1998

DATE DE REMISE DES PIÈCES

N° D'ENREGISTREMENT NATIONAL

98 15501

DÉPARTEMENT DE DÉPÔT

4

DATE DE DÉPÔT

04 DEC. 1998

2 DEMANDE Nature du titre de propriété industrielle

brevet d'invention demande divisionnaire
 certificat d'utilité transformation d'une demande de brevet européen

→ demande initiale
brevet d'invention

n° du pouvoir permanent PG 7401 références du correspondant SENSITAL téléphone 04.78.87.53.28

Établissement du rapport de recherche

différé immédiat

Le demandeur, personne physique, requiert le paiement échelonné de la redevance oui non

Titre de l'invention (200 caractères maximum)

Procédé de détection de micro-organismes et support utilisable dans un tel procédé

3 DEMANDEUR (S) n° SIREN 6 7 3 6 2 0 3 9 9

code APE-NAF

Nom et prénoms (souligner le nom patronymique) ou dénomination

Forme juridique

BIOMERIEUX

S.A.

Nationalité (s) Française

Adresse (s) complète (s)

Pays

Chemin de l'Orme
69280 MARCY L'ETOILE

FRANCE

En cas d'insuffisance de place, poursuivre sur papier libre

4 INVENTEUR (S) Les inventeurs sont les demandeurs

oui

non Si la réponse est non, fournir une désignation séparée

5 RÉDUCTION DU TAUX DES REDEVANCES

requise pour la 1ère fois

requise antérieurement au dépôt : joindre copie de la décision d'admission

6 DÉCLARATION DE PRIORITÉ OU REQUÊTE DU BÉNÉFICE DE LA DATE DE DÉPÔT D'UNE DEMANDE ANTÉRIEURE

pays d'origine

numéro

date de dépôt

nature de la demande

7 DIVISIONS antérieures à la présente demande n°

date

n°

date

8 SIGNATURE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE

(nom et qualité du signataire)

Biomerieux s.a.
Laurent CAUCAL 07.421.420 F.

siège social 69280 MARCY L'ETOILE
Tél. 78.87.20.00 - Fax. 78.87.20.90

SIGNATURE DU PRÉPOSÉ À LA RÉCEPTION

SIGNATURE APRÈS ENREGISTREMENT DE LA DEMANDE À L'INPI

D. GIRAUD

A

DEPARTEMENT DES BREVETS

26bis, rue de Saint-Pétersbourg
75800 Paris Cedex 08
Tel. : 01 53 04 53 04 - Télécopie : 01 42 93 59 30

DÉSIGNATION DE L'INVENTEUR
(si le demandeur n'est pas l'inventeur ou l'unique inventeur)

N° D'ENREGISTREMENT NATIONAL

9815521

TITRE DE L'INVENTION :

Procédé de détection de micro-organismes et support utilisable dans
un tel procédé

LE(S) SOUSSIGNÉ(S) Laurent CAUCAL
bioMérieux - Département Propriété Industrielle
Chemin de l'Orme
69280 MARCY L'ETOILE

DÉSIGNE(NT) EN TANT QU'INVENTEUR(S) (indiquer nom, prénoms, adresse et souligner le nom patronymique) :

Daniel MONGET
Résidence du Moulin
13 rue Moulin du Buis
01150 SAINT SORLIN EN BUGEY

Jean-Marc ROCHE
62 rue Ferdinand Buisson
69003 LYON

NOTA : A titre exceptionnel, le nom de l'inventeur peut être suivi de celui de la société à laquelle il appartient (société d'appartenance) lorsque celle-ci est différente de la société déposante ou titulaire.

Date et signature (s) du (des) demandeur (s) ou du mandataire

Marcy, le 30 novembre 1998


bioMérieux s.a.
s.a. au capital de 77.421.420 F.
siège social 69280 MARCY L'ETOILE
Tél. 78.87.20.00 - Fax. 78.87.20.90
RCS Lyon B 673 620 399

Laurent CAUCAL

DESCRIPTION

La présente invention concerne un procédé de détection de la présence dans un échantillon, contenu dans un récipient stérile, d'au moins un micro-organisme, aérobiose 5 ou anaérobiose, l'échantillon étant en contact avec un milieu de croissance. L'invention concerne également un support pouvant être mis en œuvre dans un tel procédé.

Il est connu que les micro-organismes aérobies (bactéries, levures) adhèrent et colonisent la majorité des surfaces qui leur sont offertes. Cette fixation améliore les échanges nutritionnels et donc le niveau de croissance des micro-organismes. Ainsi, la 10 présence d'une phase solide influence bon nombre de processus métaboliques, comme la fixation d'azote, l'oxydation alcoolique, la nitrification et la dénitrification, etc. Cette particularité est largement utilisée en microbiologie industrielle.

Ainsi, l'état de la technique peut être défini par le document US-A-5,672,484 qui a pour objet un récipient pour détecter des micro-organismes aérobies stricts dans un échantillon, qui comprend une chambre contenant un milieu de culture en son sein; et définissant un espace libre au-dessus du milieu. Ce document concerne également une méthode de fabrication d'un tel récipient et une méthode de croissance de micro-organismes aérobies stricts. Un insert non toxique hydraté avec ledit milieu de croissance possède une surface libre qui déborde au moins partiellement dans l'espace libre, afin de permettre l'approvisionnement en oxygène du milieu de croissance, et donc augmenter l'oxygénation des micro-organismes introduits dans l'échantillon, et améliorer de leur processus métabolique. Cet insert est choisi dans le groupe des matériaux suivants : éponge, coton, billes de fibres de verre et résine.

25 Toutefois, cet appareil et ce procédé sont limités à la détection des micro-organismes aérobies stricts. D'ailleurs, et de manière très explicite, il est fait état de la nécessité d'augmenter les échanges en oxygène entre le support et l'espace libre et confiné du récipient. Pour ce faire, l'insert est positionné à l'interface constituée par le milieu de culture, d'une part, et l'espace libre, d'autre part. Toutes ces caractéristiques

ne pouvaient que détourner l'homme du métier de l'intérêt d'utiliser, au sein dudit récipient, un support solide, inerte et stérile, même dans des conditions d'anaérobiose.

Les résultats obtenus par la demanderesse lors de ces travaux d'étude étaient donc inattendus.

5

La présente invention cherche à protéger un procédé qui est bien plus polyvalent, car utilisable avec tous les micro-organismes, quel que soit leur métabolisme respiratoire. De plus, la disposition des inserts ou supports au sein du récipient n'a pas à suivre un cadre aussi contraignant que ce qui est nécessaire pour le 10 document de l'état de la technique.

10

A cet effet, la présente invention concerne un procédé de détection de la présence dans un échantillon, contenu dans un récipient stérile, d'au moins un micro-organisme, quel que soit son métabolisme respiratoire, l'échantillon étant en contact 15 avec un milieu de croissance, caractérisé en ce qu'il consiste à :

15

- ajouter au sein du récipient au moins un support solide, inerte et stérile,
- incuber à une température appropriée, et
- observer une variation d'au moins une caractéristique liée à la présence du ou des micro-organismes à détecter au sein dudit récipient.

20

La caractéristique observée est due à une variation d'au moins un indicateur, ajouté dans le récipient avant l'incubation, par exemple un indicateur coloré ou fluorescent, et/ou d'au moins un paramètre physico-chimique ou électrique, par exemple la production de CO₂ la pression, la turbidité, le potentiel d'oxydoréduction et/ou le pH.

25

Dans tous les cas de figure, l'échantillon est soit biologique, par exemple sang, liquide céphalo-rachidien, liquides pleuraux, urine, soit non biologique, par exemple eau, produits alimentaires, produits pharmaceutiques.

La lecture de la variation du ou des indicateur(s) s'effectue de manière optique au travers de toute ou partie d'au moins une des parois du récipient, qui est

transparente, et/ou la lecture de la modification du ou des paramètre(s) s'effectue par l'intermédiaire de capteur(s) physico-chimique(s) ou électrique(s).

Préférentiellement, le procédé s'applique aux micro-organismes à métabolisme anaérobie.

5 Ce procédé est utilisé dans un contrôle de stérilité.

La présente invention concerne également un support solide, inerte et stérile, utilisé dans le procédé, défini précédemment, qui, dans un second mode de réalisation, est caractérisé par le fait qu'il est constitué de matériaux naturels, par exemple :

- billes de silice,
- 10 - billes de verre de petite taille (pleines, creuses ou poreuses),
- particules de quartz,
- grains de sable ,
- grains de vermiculite, zéolite et/ou feldspath,
- laine de verre et/ou de roche,
- 15 - billes d'argile, et
- particules de liège.

Selon un second mode de réalisation, le support solide, inerte et stérile, utilisé dans le procédé ci-dessus, est constitué de matériaux artificiels, par exemple :

- billes de polystyrène,
- 20 - billes de polyéthylène,
- billes de polypropylène,
- billes de polyéthylène de petite taille agglomérées, de porosité et d'épaisseur variables,
- supports de croissance sous forme de billes de petite taille utilisés en culture cellulaire,
- 25 - billes de latex ,
- billes revêtues de gélatine, et
- grains de résine.

Selon un troisième mode de réalisation, le support solide, inerte et stérile, utilisé dans le procédé ci-dessus est constitué d'un élément de toute forme en

polyéthylène. Quel que soit le mode de réalisation, ce support est constitué de billes ou grains d'un diamètre compris entre 1 μm et 10 mm, et notamment entre 0,1 mm et 5 mm.

5 Les figures ci-jointes sont données à titre d'exemple explicatif et n'ont aucun caractère limitatif. Elles permettront de mieux comprendre l'invention.

La figure 1 représente une courbe de la cinétique de croissance dans le cas de *Haemophilus influenzae*.

10 La figure 2 représente une courbe de la cinétique de croissance dans le cas de *Kingella denitrificans*.

La figure 3 représente une courbe de la cinétique de croissance dans le cas de *Staphylococcus saprophyticus*.

La figure 4 représente une courbe de la cinétique de croissance dans le cas de *Bacteroides fragilis*.

15 La figure 5 représente une courbe de la cinétique de croissance dans le cas de *Veillonella parvula*.

Enfin, la figure 6 représente une courbe de la cinétique de croissance dans le cas de *Clostridium sporogenes*.

20 La présente invention concerne un procédé de détection de la présence dans un échantillon, contenu dans un récipient stérile, d'au moins un micro-organisme, aérobie ou anaérobie, l'échantillon étant en contact avec un milieu de croissance.

Cette détection est en fait accélérée par le fait que l'on introduit dans le récipient un support solide, inerte et stérile.

25 La liste ci-dessous regroupe des supports permettant d'accélérer le temps de détection de micro-organismes présents dans un échantillon. Cette liste n'est bien entendu pas limitative.

Dans le cas de supports dits naturels, on peut utiliser :

- des billes de silice,
- 30 - des billes de verre de petite taille qui peuvent être pleines, creuses ou poreuses,

- des particules de quartz,
- des grains de sable ,
- des grains de vermiculite, zéolite et/ou feldspath,
- de la laine de verre ou de roche,
- 5 - des billes d'argile, et
- des particules de liège.

Dans le cas de supports dits artificiels, on peut utiliser :

- des billes de polystyrène,
- des billes de polyéthylène,
- 10 - des billes de polypropylène,
- des billes de polyéthylène de petite taille agglomérées, de porosité et d'épaisseur variables,
- des supports de croissance sous forme de billes, de petite taille, utilisés en culture cellulaire de marque déposée CYTODEX de type 1 et 3,
- 15 - des billes de latex,
- des billes recouverte de gélatine, et
- des grains de résine di-éthyl-amino-éthyle (DEAE) pour les résines échangeuses d'anions ou de marque déposée SEPHADEX (CM = Carboxy Méthyl cellulose) pour les résines échangeuses de cations.

20 Bien entendu, les supports ajoutés dans un seul récipient peuvent être constitués d'un mélange d'au moins deux supports artificiels ou naturels, ci-dessus mentionnés ou bien d'un mélange d'au moins un support artificiel et d'au moins un support naturel, ci-dessus mentionnés.

25 **Mise en œuvre :**

La mise en œuvre présentée concerne un mode particulier de réalisation, il existe bien d'autres possibilités. Cette mise en œuvre ne peut donc être considérée comme limitant la portée de la protection recherchée.

1. Préparation des flacons :

Tous les supports ont été stérilisés par un chauffage de 15 minutes (mn) à 120 degrés Celsius (°C). Après séchage pendant 24 heures à 37°C, ils ont été répartis 5 stérilement dans les flacons. La quantité introduite par flacon dépend du support utilisé et est ajustée de façon à obtenir une couche de matériau dont la surface soit sensiblement équivalente à la section des flacons. Les flacons contenant les supports sont à nouveau chauffés 15 mn à 120°C puis reçoivent stérilement 40 ml de bouillon nutritif aérobiose VITAL AER (Réf. 52511 de bioMérieux) ou de bouillon nutritif 10 anaérobiose VITAL ANA (Réf. 52512 de bioMérieux) contenant le traceur de croissance microbienne ou indicateur, tel que décrit et revendiqué dans le brevet EP-B-0.424.293 de la demanderesse.

Les flacons sont ensuite mis sous vide et gazés de manière à reconstituer une 15 atmosphère adaptée au type de bouillon concerné (aérobiose pour VITAL AER ou anaérobiose pour VITAL ANA). Ils sont ensuite bouchonnés et capsulés pour être prêts à l'emploi.

Afin de pouvoir comparer les performances de l'adjonction des supports selon la 20 présente invention sur des milieux, des flacons VITAL AER et ANA sans support ont subi le même processus de fabrication, à l'exception de la préparation et de l'addition du support.

2. Analyse des échantillons :

25 Les flacons, tels que préparés ci-dessus, reçoivent ensuite stérilement un échantillon (biologique ou non) dans lequel on veut rechercher la présence de micro-organismes.

Dans le cas d'une simulation d'hémocultures positives comme cela a été le cas 30 au laboratoire, il a été procédé de la façon suivante. Premièrement, les micro-

organismes étudiés sont préalablement cultivés sur milieu de croissance adapté tel qu'une gélose, généralement une gélose Columbia avec 5% de sang de mouton.

Pour chacun d'eux, une suspension est réalisée en eau distillée en prélevant une ou plusieurs colonies. Cette suspension est calibrée à 10^8 cellules/ml et diluée au millionième. A l'aide d'une seringue stérile, un millilitre de cette dilution est introduit dans chaque flacon VITAL avec ou sans support préalablement inoculé par 5 ml de sang de cheval ou de sang humain. Ainsi, environ cent cellules de micro-organisme sont introduites par flacon.

Les flacons, contenant l'échantillon à analyser, sont placés dans le système de marque VITAL (réf. : 99105, 99106 ou 99122 de bioMérieux) qui joue le rôle à la fois d'un incubateur et d'un lecteur. Ce système assure une incubation des flacons à une température appropriée. La cinétique de l'indicateur est suivie par une mesure optique à travers la paroi en verre transparente des flacons. Si l'échantillon contient au départ des micro-organismes, ceux-ci vont se multiplier au cours de l'incubation et la modification de l'indicateur, présent dans le milieu réactionnel, traduira la présence desdits micro-organismes dans l'échantillon.

L'efficacité d'un support sera appréciée en comparant les temps de détection obtenus en utilisant des flacons avec et sans support.

20

Exemples selon l'invention :

25

Exemple 1 : Détection de micro-organismes à métabolisme aérobie

L'essai a été effectué dans les conditions suivantes :

- flacons VITAL AER avec et sans support, préparés selon le processus décrit dans le paragraphe "Préparation des flacons",
- supports étudiés : billes de polyéthylène et particules de liège,

30

- souches testées :

- *Haemophilus influenzae* (réf. bioMérieux : JHI 8006064),
- *Kingella denitrificans* (réf. bioMérieux : JKD 8311002), et
- *Staphylococcus saprophyticus* (réf. bioMérieux : MSA 54677),

- 5 - milieu d'isolement des souches : gélose Columbia bioMérieux additionnée par 5% de sang de mouton,
- simulation d'hémocultures positives comme indiqué dans le paragraphe « Analyse des échantillons », avec addition stérile d'environ cent micro-organismes et de 5 ml de sang de cheval par flacon,
- 10 - détermination des temps de positivité des flacons par le système VITAL, et
- tracé de cinétique de croissance pour chaque flacon.

Les résultats obtenus sont bien représentés sur le tableau 1 qui suit.

Souches	Flacons sans support	Flacons avec billes de polyéthylène	Flacons avec particules de liège
<i>Haemophilus influenzae</i>	45,6	22,5 (50,6 %)	31,2 (31,6 %)
<i>Kingella denitrificans</i>	83,0	52,0 (37,3 %)	30,0 (63,9 %)
<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	35,5	28,0 (21,1 %)	30,0 (15,5 %)

15

Tableau 1 : Temps de détection en heures et gain de temps en % de l'utilisation des flacons avec supports par rapport aux flacons sans support dans le cas de micro-organismes aérobies, anaérobies facultatifs

20

Ce tableau 1 ci-dessus indique un gain en temps de détection par rapport aux flacons sans support compris entre 21,1 à 50,6 % selon les souches en présence de billes de polyéthylène. Cette fourchette s'échelonne entre 15,5 à 63,9 % selon les souches en présence de particules de liège.

L'effet des supports peut être visualisé sur les cinétiques de croissance présentées sur la figure 1 dans le cas de *Haemophilus influenzae*, sur la figure 2 dans le cas de *Kingella denitrificans* et sur la figure 3 dans le cas de *Staphylococcus saprophyticus*.

5

Exemple 2 : Détection de micro-organismes à métabolisme anaérobiose strict

L'essai a été effectué dans les conditions suivantes :

- flacons VITAL ANA avec et sans support, préparés selon le processus décrit dans le paragraphe "Préparation des flacons",

- supports étudiés : billes de polyéthylène et particules de liège,

- souches testées :

- *Bacteroides fragilis* (réf. bioMérieux : HBF 358),

- *Veillonella parvula* (réf. bioMérieux : JKD 8311002), et

- *Clostridium sporogenes* (réf. bioMérieux : ACO 100651),

- milieu d'isolement des souches : gélose Columbia bioMérieux additionnée par 5% de sang de mouton incubée en anaérobiose,

- simulation d'hémocultures positives comme indiqué dans le paragraphe "Analyse des échantillons", avec addition stérile d'environ cent micro-organismes et de 5 ml de sang de cheval par flacon,

- détermination des temps de positivité des flacons par le système VITAL, et

- tracé de cinétique de croissance pour chaque flacon.

Les résultats obtenus sont bien représentés sur le tableau 2 qui suit.

25

Souches	Flacons sans support	Flacons avec billes de polyéthylène	Flacons avec particules de liège
<i>Bacteroides fragilis</i>	87,0	44,5 (48,6 %)	67,0 (23,0 %)
<i>Veillonella parvula</i>	200,0	55,0 (72,5 %)	75,0 (62,5 %)

<i>Clostridium sporogenes</i>	46,0	30,0 (34,8 %)	42,0 (8,7 %)
-------------------------------	------	---------------	--------------

Tableau 2 : Temps de détection en heures et gain de temps en % de l'utilisation des flacons avec supports par rapport aux flacons sans support dans le cas de micro-organismes anaérobies

5

Le tableau 2 ci-dessus indique un gain en temps de détection par rapport aux flacons sans support de 34,8 à 72,5% selon les souches, en présence de billes de polyéthylène, et de 8,7 à 62,5% selon les souches, en présence de particules de liège.

10

L'effet des supports peut être visualisé sur les cinétiques de croissance présentées sur la figure 4 dans le cas de *Bacteroides fragilis*, sur la figure 5 dans le cas de *Veillonella parvula* et sur la figure 6 dans le cas de *Clostridium sporogenes*.

15

Que l'on se reporte à l'exemple 1 ou à l'exemple 2, on constate donc une nette diminution des temps de détection qui traduit la positivité des flacons contenant un support, qui est le résultat d'un virage plus rapide de l'indicateur, et cela aussi bien pour les micro-organismes à métabolisme aérobie qu'à métabolisme anaérobie.

Exemple 3 : Etude complémentaire sur la détection de différents micro-organismes à métabolisme aérobie, anaérobie facultatif (AAF)

20

Dans cet exemple, les souches AAF utilisées sont soit des bactéries soit des levures. De plus, plusieurs analyses ont été réalisées pour chaque espèce étudiée. Elles appartiennent aux différentes espèces ou genres suivants :

25

- *Neisseria*,
- *Brucelles*,
- Levures : *Candida albicans*, *Candida parapsilosis*, *Candida guillermondii*,
- *Staphylococcus*,
- *Pseudomonas*, et

- Autres souches appartenant à : *Haemophilus*, *Kingella*, *Eikenella* et *Micrococcus*.

5 Les résultats obtenus sont bien représentés sur le tableau 3 qui suit. Toutes les valeurs exposées correspondent aux temps de détection en présence de supports exprimés en pourcentage par rapport aux temps de détection obtenus avec des flacons sans support et considérés comme ayant une valeur de 100 %.

Espèces aérobies	Nb de souches par espèce	Polyéthylène	Polypropylène
<i>Neisseria</i>	3	77,8	104,3
<i>Brucelles</i>	3	80,4	124,0
Levures	6	70,6	103,6
<i>Staphylococcus</i>	5	83,6	95,9
<i>Pseudomonas</i>	2	74,6	174,3
Autres souches	4	60,8	85,9
Moyenne pour toutes espèces	23	74,6	114,7

10 **Tableau 3 : Influence de la nature des supports sur la détection de plusieurs micro-organismes aérobies**

15 Ce tableau 3 indique clairement que le support de polyéthylène permet de réduire significativement les temps de détection de l'ensemble des espèces ou genres testés, ces temps variant de 60,8 % à 83,6 % par rapport aux temps obtenus avec les flacons sans support (100 %).

20 Le support de polypropylène n'offre pas d'intérêt car il ralentit les temps de détection dans bon nombre de cas, c'est-à-dire que la valeur est supérieure à la valeur de 100 % obtenue pour la référence en ce qui concerne les flacons sans support. Cette valeur peut même atteindre 174,3 % pour *Pseudomonas*.

Exemple 4 : Etude de l'influence du support de polyéthylène sur la détection de micro-organismes à métabolisme anaérobie

Dans cet exemple, les souches utilisées sont des bactéries anaérobies appartenant aux genres suivants : * *Bacteroides*,
 5 * *Clostridium*,
 * *Peptostreptococcus*,
 * *Veillonella*, et
 * *Fusobacterium*.

10 Les résultats obtenus sont bien représentés sur le tableau 4 qui suit.

Toutes les valeurs exposées sont des pourcentages qui, comme pour le tableau 3, correspondent aux temps de détection en présence de support, exprimés en pourcentage par rapport aux temps de détection sans support rapportés à 100 %.

Espèces anaérobies	Nombre de souches par espèce	Polyéthylène
<i>Clostridium</i>	2	69,0
<i>Bacteroides</i>	7	64,5
<i>Peptostreptococcus</i>	2	97,3
<i>Veillonella</i>	2	27,6
<i>Fusobacterium</i>	1	70,6
Moyenne pour toutes espèces	14	65,8

15

Tableau 4 : Influence du support sur la détection de plusieurs micro-organismes anaérobies

Ce tableau 4 ci-dessus indique un gain en temps de détection par rapport aux flacons sans support compris entre 2,7 et 72,4 % selon les espèces anaérobies testées.
 20

Ainsi, comme le montrent les exemples ci-dessus, l'efficacité du procédé est avérée. Ceci est vrai pour les procédés utilisés dans des hémocultures (recherche de micro-organismes dans le sang), mais également pour d'autres applications basées sur la culture de micro-organismes.

5

Ce procédé consiste essentiellement en quatre ou cinq étapes successives.

Premièrement, il convient d'ajouter l'échantillon à analyser au sein du récipient et un milieu de croissance. Deuxièmement, il faut également ajouter au sein dudit récipient au moins un support solide, inerte et stérile. Troisièmement et éventuellement, on peut sceller le récipient. Quatrièmement, on incube à une température appropriée. Enfin et cinquièmement, on observe une variation d'une caractéristique en relation avec la présence, la croissance et/ou le métabolisme d'un micro-organisme à détecter.

10

Cette caractéristique peut généralement être de deux natures différentes.

15

D'une part, il peut s'agir d'un indicateur chimique, par exemple coloré, fluorescent, chromogène, qui est ajouté dans le récipient avant l'incubation. D'autre part, il peut s'agir d'un paramètre physico-chimique ou électrique, qui est modifié par la simple croissance des micro-organismes à détecter. Dans ce dernier cas, il n'est pas nécessaire d'ajouter de substance pour permettre l'établissement d'une variation de ce paramètre. Cette observation d'une variation d'une caractéristique peut être manuelle, c'est-à-dire visuelle, ou bien automatique. Dans le cas d'une observation automatique, le ou les paramètres peuvent être observés par des capteurs qui, par exemple mesurent la pression, la production de CO_2 , la turbidité, le potentiel d'oxydoréduction ou le pH. Cette énumération n'est pas limitative, et elle peut contenir toute caractéristique physico-chimique ou électrique pouvant varier avec l'activité métabolique d'un micro-organisme.

20

25

En ce qui concerne la température d'incubation appropriée, mentionné dans le procédé ci-dessus exposé, celle-ci varie en fonction de la famille, de l'espèce ou du genre du micro-organisme testé. Ainsi, cette variation est très large et est comprise entre sensiblement 0 et 100 °C selon le micro-organisme. Ces températures sont

30

toutefois bien connues de l'homme du métier et/ou ne présentent aucune difficulté à être déterminée.

Ce procédé peut également être utilisé, en plus de l'analyse des échantillons 5 dans lequel on veut mettre en évidence la présence de micro-organismes, dans la recherche de la stérilité (liquides biologiques : sang, liquide céphalo-rachidien, liquides pleuraux, urine, etc., échantillons non biologiques tels que l'eau, les produits alimentaires ou pharmaceutiques).

10 Les résultats présentés dans les exemples ci-dessus permettent de démontrer l'impact des supports de croissance sur les temps de détection de micro-organismes aussi bien aérobies et qu'anaérobies (ces derniers exigeant pour leur croissance une atmosphère N_2/CO_2 sans O_2). La majorité des temps de détection a été diminuée de façon significative.

15 Les exemples se limitent à l'utilisation de certains supports et à l'étude de leur impact sur la détection de certains micro-organismes. Mais, des résultats similaires ont d'ores et déjà été obtenus avec d'autres supports et en étendant l'étude à d'autres micro-organismes. La portée de la présente invention n'est donc pas limitée aux espèces et aux supports étudiés.

20 En conclusion, la présence d'un support selon l'invention améliore de façon significative la rapidité de détection de la présence de micro-organismes dans un échantillon, quel que soit son métabolisme, aérobie ou anaérobie. Un tel résultat a été obtenu sans avoir à rechercher l'effet d'une meilleure oxygénation ou d'une meilleure 25 exposition des micro-organismes à l'oxygène pouvant être présent dans le milieu.

REVENDICATIONS

1. Procédé de détection de la présence dans un échantillon, contenu dans un récipient stérile, d'au moins un micro-organisme, quel que soit son métabolisme respiratoire, l'échantillon étant en contact avec un milieu de croissance, caractérisé en ce qu'il consiste à :
 - ajouter au sein du récipient au moins un support solide, inerte et stérile,
 - incuber à une température appropriée, et
 - observer une variation d'au moins une caractéristique liée à la présence du ou des micro-organismes à détecter au sein dudit récipient.
2. Procédé, selon la revendication 1, caractérisé en ce que la caractéristique observée est due à une variation d'au moins un indicateur chimique, ajouté dans le récipient avant l'incubation par exemple un indicateur coloré ou fluorescent, et/ou d'au moins un paramètre physico-chimique ou électrique par exemple la production de CO₂, la pression, la turbidité, le potentiel d'oxydoréduction et/ou le pH.
3. Procédé, selon l'une quelconque des revendications 1 ou 2, caractérisé en ce que l'échantillon est biologique, par exemple sang, liquide céphalo-rachidien, liquides pleuraux, urine, ou non biologique, par exemple eau, produits alimentaires, produits pharmaceutiques.
4. Procédé, selon l'une quelconque des revendications 1 à 3, caractérisé en ce que la lecture de la variation du ou des indicateur(s) s'effectue de manière optique au travers de toute ou partie d'au moins une des parois du récipient, qui est transparente, et/ou la lecture de la modification du ou des paramètre(s) s'effectue par l'intermédiaire de capteur(s) physico-chimique(s) ou électrique(s).

5. Procédé, selon l'une quelconque des revendications 1 à 4, caractérisé en ce qu'il s'applique aux micro-organismes à métabolisme anaérobie.

6. Procédé, selon l'une quelconque des revendications 1 à 5, caractérisé en ce qu'il est utilisé dans un contrôle de stérilité.

7. Support solide, inerte et stérile, utilisé dans le procédé, défini à l'une quelconque des revendications 1 à 6, caractérisé par le fait qu'il est constitué de matériaux naturels, par exemple :

- 10 - billes de silice,
- billes de verre de petite taille (pleines, creuses ou poreuses),
- particules de quartz,
- grains de sable ,
- grains de vermiculite, zéolite et/ou feldspath,
- 15 - laine de verre et/ou de roche,
- billes d'argile, et
- particules de liège.

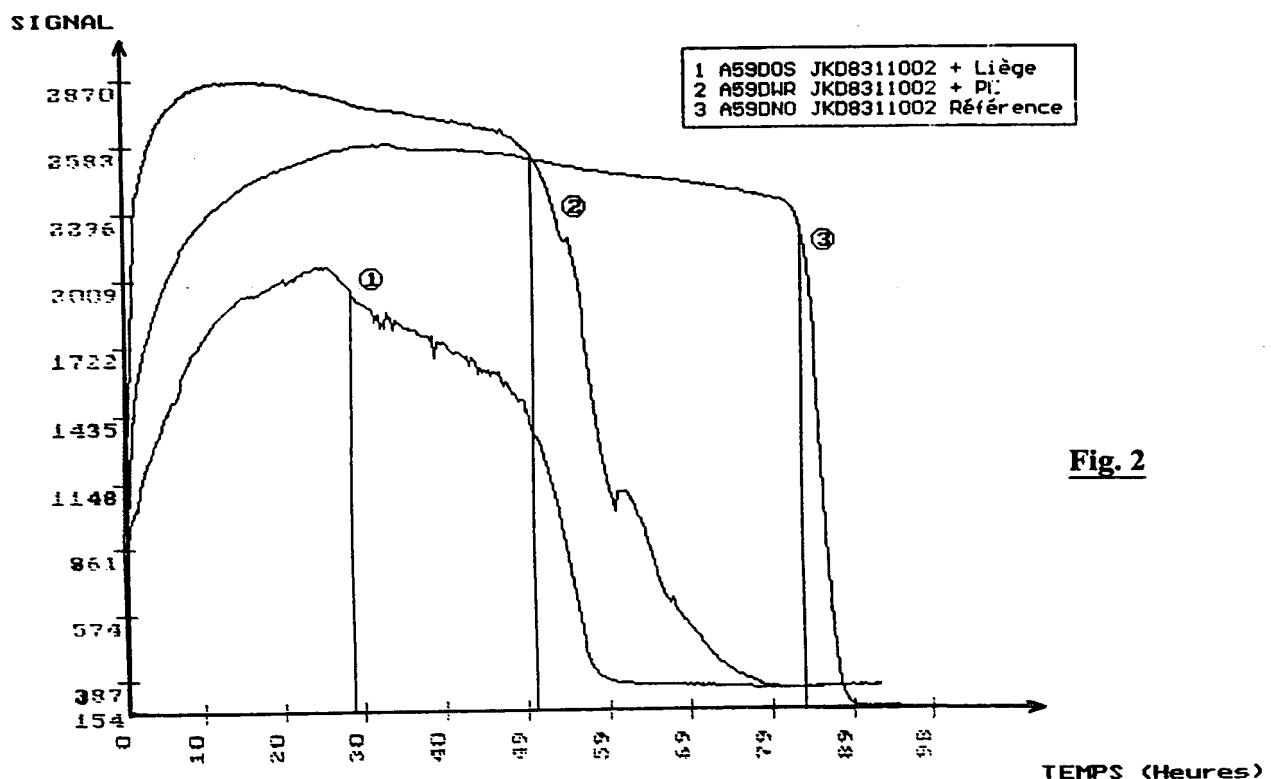
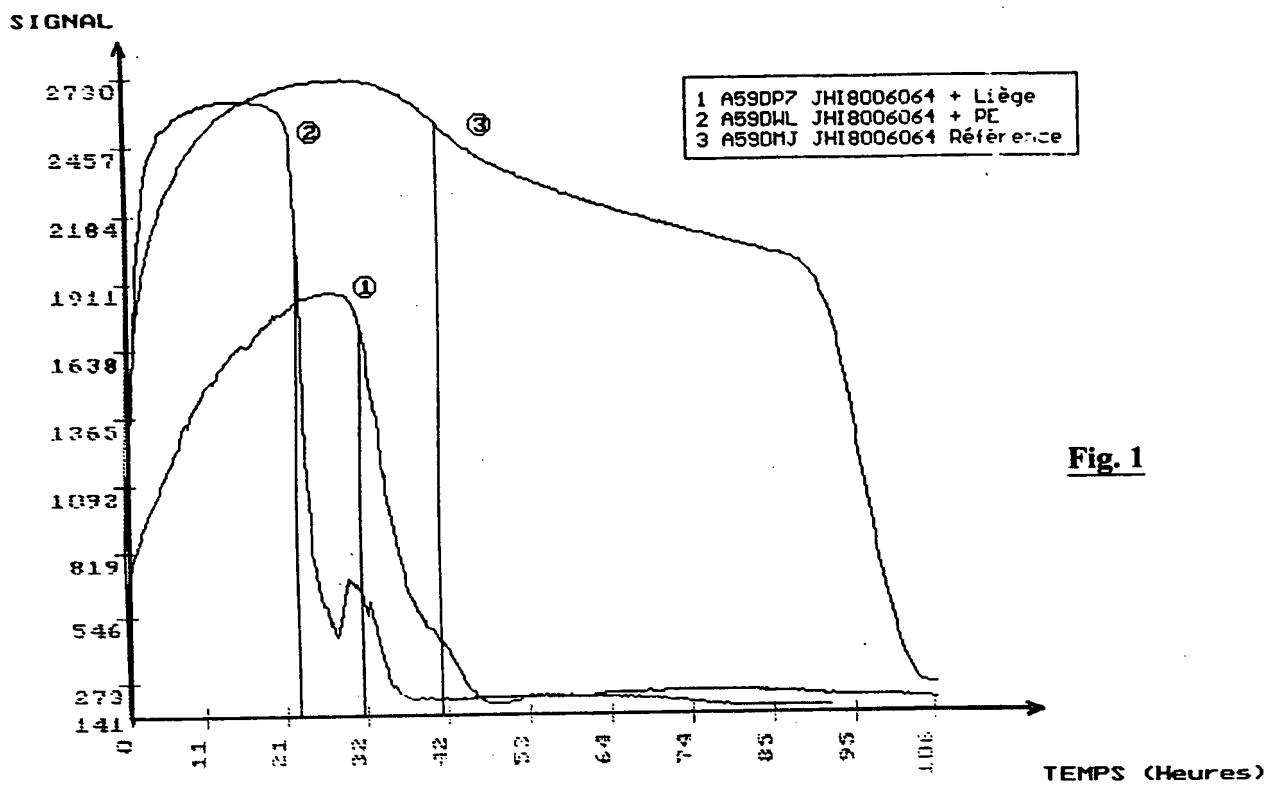
8. Support solide, inerte et stérile, utilisé dans le procédé, défini à l'une quelconque des revendications 1 à 6, caractérisé par le fait qu'il est constitué de matériaux artificiels, par exemple :

- 20 - billes de polystyrène,
- billes de polyéthylène,
- billes de polypropylène,
- 25 - billes de polyéthylène de petite taille agglomérées, de porosité et d'épaisseur variables,
- supports de croissance sous forme de billes de petite taille utilisés en culture cellulaire,
- billes de latex ,
- 30 - billes revêtues de gélatine, et

- grains de résine.

9. Support solide, inerte et stérile, utilisé dans le procédé, défini à l'une quelconque des revendications 1 à 6, caractérisé par le fait qu'il est constitué d'un élément de toute forme en polyéthylène.

10. Support, selon l'une quelconque des revendications 7 ou 9, caractérisé par le fait qu'il est constitué de billes ou grains d'un diamètre compris entre 1 µm et 10 mm et notamment entre 0,1 mm et 5 mm.



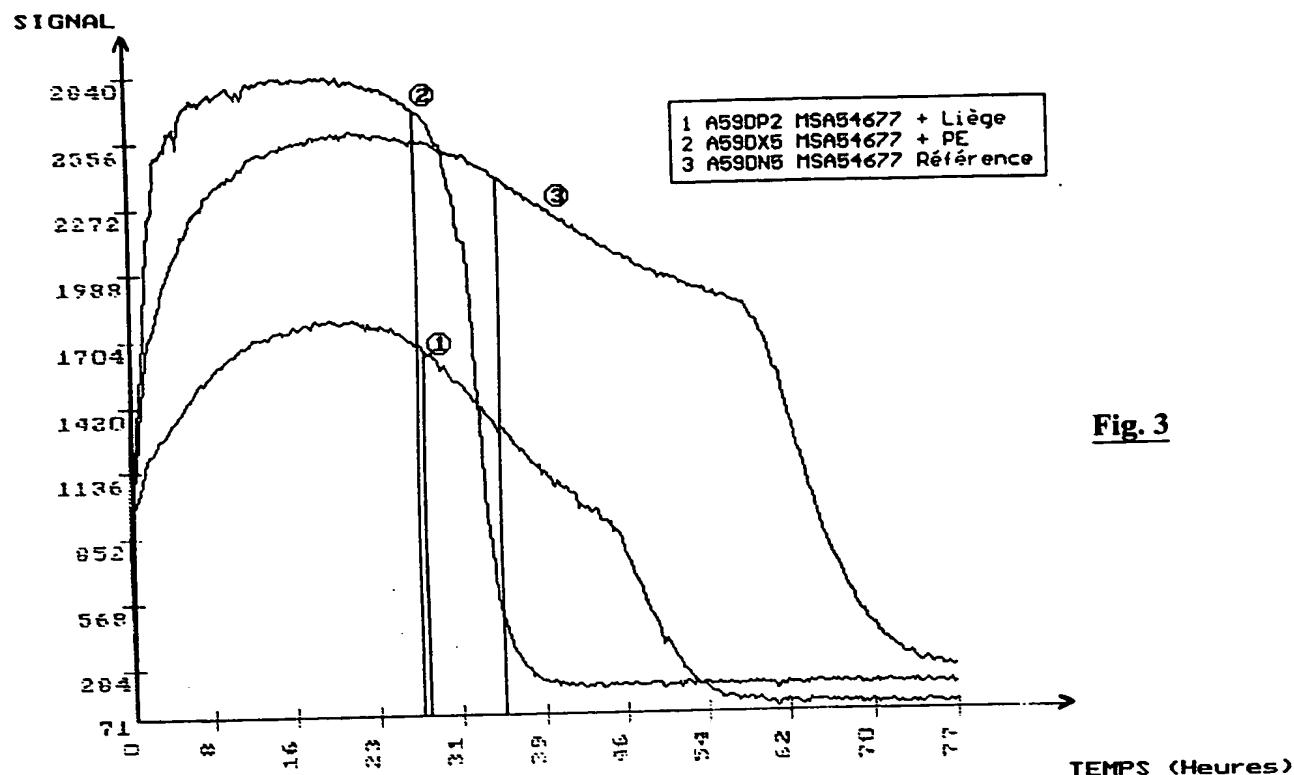


Fig. 3

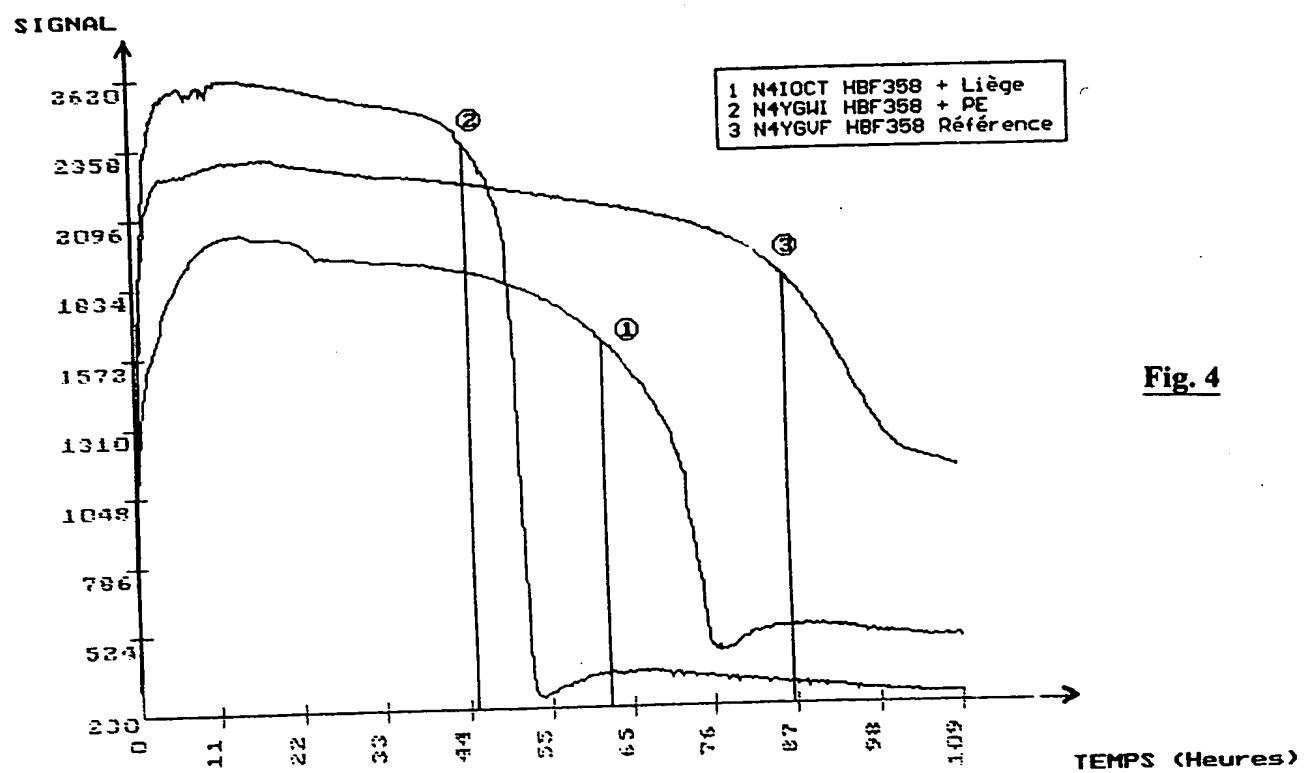
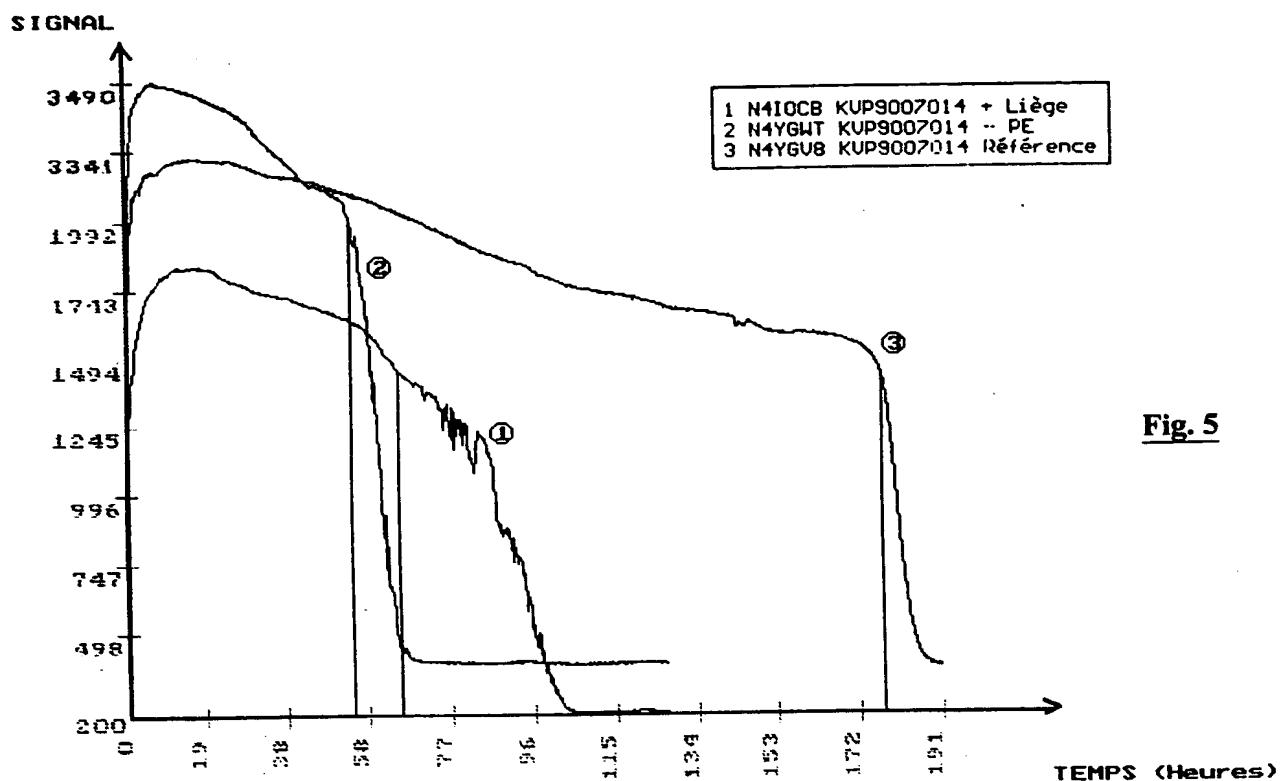
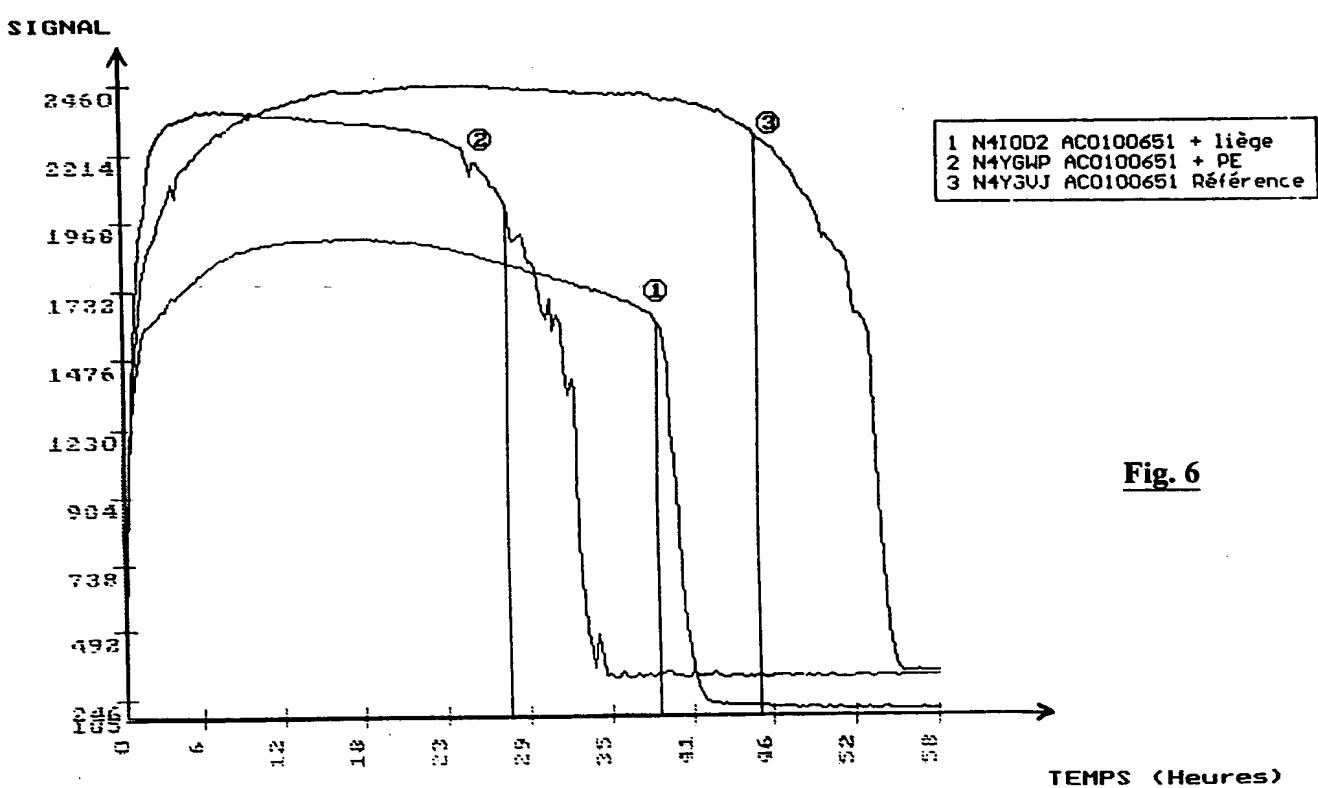


Fig. 4

**Fig. 5****Fig. 6**